

ANTONIO MORETTI\*, STEFANIA SOMMA\*, GIUSEPPINA MULÈ\*,  
CATERINA MORCIA\*\*, MARTINA SPINI\*\*, MICHELE A. STANCA\*\*\*,  
VALERIA TERZI\*\*

## Biodiversità delle specie di *Fusarium* tossinogeniche coinvolte nella fusariosi della spiga di frumento duro: patogenicità, genetica, tossicità

### INTRODUZIONE

Nell'ultima decade si è assistito a un significativo incremento delle manifestazioni associate alla presenza di patogeni fungini produttori di micotossine nelle coltivazioni cerealicole a livello mondiale (Goswami e Kistler, 2004). La conseguenza di tale diffusione è la contaminazione da micotossine nei cereali che rappresenta un serio rischio alimentare sia per il genere umano sia per gli animali in allevamento. La loro formazione nelle colture contaminate e la loro persistenza in alimenti e mangimi può essere, infatti, spesso associata a diversi tipi di malattia, fra cui l'induzione di varie forme di cancro, mutazioni genetiche e disordini estrogenici, gastrointestinali, urogenitali, vascolari, renali e nervosi. Alcune tossine, inoltre, possono compromettere il sistema immunitario e, quindi, ridurre la resistenza alle malattie. Inoltre, perdite economiche significative sono correlate all'impatto delle micotossine sulla salute umana, sulla produttività degli allevamenti e sul commercio nazionale e internazionale. Si stima che il 25% delle colture agroalimentari a livello mondiale, tra cui molti alimenti di base, siano contaminati da funghi micotossigeni, con la possibilità che le contaminazioni a carico dei cereali siano ancora più pesanti (CAST, 2003). In particolare, il frumento è una coltura che può essere generalmente contaminata da tre fra i cinque più importanti funghi produttori di micotossine: *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* e *Fusarium graminearum* (Marasas et al., 2008). Pertanto, tre delle micotossine più im-

\* Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR-BARI

\*\* CRA-GPG, Centro di Ricerca per la Genomica e la Postgenomica Animale e Vegetale, Fiorenzuola d'Arda (PC)

\*\*\* Facoltà di Agraria, Università di Modena e Reggio Emilia

portanti presenti naturalmente nei prodotti agricoli, ocratossina (prodotta da *A. ochraceus* e *P. verrucosum*), deossinivalenolo (DON) e zearalenone (ZEA, entrambi prodotti da *F. graminearum*) possono essere comuni contaminanti del frumento (Miller et al., 1995). Inoltre, la contaminazione da micotossine può estendersi oltre la fase di campo, protrahendosi al magazzino, durante lo stoccaggio, e alle diverse fasi di trasformazione da parte delle industrie agro-alimentari. Fra gli aspetti fondamentali della presenza di micotossine nelle derrate, particolare importanza assume la generale stabilità di questi composti che rende insufficienti, ai fini della decontaminazione e/o detossificazione, i normali processi impiegati nelle industrie alimentari quali, ad esempio, i trattamenti fisici (calore), chimici (raffinazione) e biologici (fermentazione). Pertanto, una volta presenti nella materia prima in lavorazione tali composti tossici permangono attivi, in percentuale variabile secondo il tipo di micotossina, lungo tutto il ciclo produttivo (Abecassis e Feillet, 2003).

#### LA FUSARIOSI DELLA SPIGA DI FRUMENTO E RELATIVE MICOTOSSINE

I frumenti (*Triticum aestivum* e *Triticum durum*) sono colture soggette all'attacco di numerose fitopatie di origine fungina, tra cui la fusariosi della spiga (FSF) è frequentemente ricorrente in Italia (Pasquini e Delogu, 2005). La FSF è ritenuta a livello mondiale una delle più gravi malattie fungine trasmesse per seme, in quanto causa di forti perdite di produzione e danni qualitativi: l'infezione compromette infatti il buon riempimento della cariosside con consistenti cali produttivi e può indurre lo sviluppo di pericolose micotossine con conseguente contaminazione delle farine e dei prodotti derivati. Questa malattia fungina, descritta per la prima volta alla fine del 1800 nei Paesi del Nord Europa, ha avuto una diffusione esponenziale durante l'ultimo secolo (Stack, 2003), espandendosi in Asia, Canada, Europa e Sud America, come riportato dal CIMMYT. I funghi del genere *Fusarium* sono in grado di colonizzare la spiga a partire dalla fine della spigatura fino allo stadio di maturazione latteo-cerosa della cariosside; il periodo di maggiore suscettibilità alla FSF coincide con quello corrispondente all'antesi, durante il quale specifiche sostanze come la betaina e la colina, stimolanti la germinazione delle spore del micete, vengono fornite dal polline del fiore. L'espandersi dell'invasione del saprofita dal fiore ai tessuti conduttori del rachide può portare al conseguente disseccamento delle spighe (Pancaldi e Alberti, 2001). La colonizzazione della granella da parte di questi patogeni può danneggiare seriamente la qualità del seme a causa della distruzione dei granuli di amido, delle pareti cellulari

e delle proteine di riserva con una conseguente drastica diminuzione della capacità germinativa del seme stesso (Bechtel et al., 1985).

Il principale agente causale della FSF è *F. graminearum* (teleomorfo, *Gibberella zeae*), una specie descritta recentemente come un complesso di specie, a seguito di una profonda revisione tassonomica eseguita in base a studi filogenetici. Inoltre, molte altre specie di *Fusarium* sono state associate alla malattia. In particolare, in Europa e in Italia, diverse indagini hanno permesso di associare alla FSF soprattutto *F. avenaceum*, *F. culmorum* e *F. poae*; in misura minore sono state associate *F. acuminatum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* e *F. tricinctum*. Oltre a causare notevoli perdite di efficienza, le specie di *Fusarium* che causano la FSF possono accumulare nei cereali infetti, in determinate condizioni ambientali, le relative micotossine (Logrieco e Moretti, 2008). L'importanza di individuare con la massima cura possibile le specie coinvolte nella FSF è determinata anche dal fatto che la capacità tossinogenica degli agenti patogeni della fusariosi può essere estremamente specifica e cambiare dunque notevolmente non solo da una specie all'altra, ma anche all'interno di una stessa specie (Desjardins, 2006). Infatti, per quanto riguarda le specie principali, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae* e *F. sporotrichioides*, ciascuna può produrre una gamma specifica di tricoteceni, potenti inibitori della sintesi proteica (vedi paragrafo successivo), mentre *F. avenaceum* e *F. tricinctum* sono noti per la produzione di moniliformina, beauvericina ed enniatine, metaboliti di minore tossicità rispetto ai tricoteceni (Desjardins, 2006). Pertanto, le conseguenze della FSF sul consumo animale e umano dei cereali contaminati possono variare notevolmente a seconda della distribuzione e della predominanza delle diverse specie di *Fusarium* che si alternano sul frumento. A tale riguardo, occorre sottolineare come la diffusione di specie tossinogeniche di *Fusarium* sia determinata soprattutto dai fattori climatici, in particolare temperatura e umidità, e da fattori agronomici, quali rotazioni colturali, lavorazioni, fertilizzazioni e trattamenti fungicidi (Jennings et al., 2004). In particolare, pratiche colturali come la permanenza di residui vegetali invernali della coltivazione precedente, possono favorire l'infezione di *F. graminearum* attraverso le ascospore, spore germinative di origine sessuale, che quindi svolgono un ruolo importante nel predominio di tale agente patogeno nell'infezione dell'anno successivo. Tuttavia, sulle spighe di grano si possono spesso ritrovare combinazioni di *Fusarium* patogeni che co-abitano e possono avere un effetto sinergico nel determinare l'insorgenza dei sintomi della FSF. È molto interessante sottolineare anche che l'impatto dell'ambiente nel condizionare il tipo di associazionismo fra le specie di *Fusarium* nell'attaccare il frumento, la loro eventuale rotazione

sulle piante infette o anche la loro competizione, sono aspetti ancora poco chiariti.

Le piante di grano sono più suscettibili alla malattia durante l'antesi ed è collettivamente accettato che la fusariosi risulta più acuta quando condizioni meteorologiche caratterizzate da caldo e umido prevalgono durante l'antesi. Tuttavia, vi sono ancora dati insufficienti per comprendere l'impatto delle condizioni ambientali sulle singole specie agenti della fusariosi e su come e quanto questi parametri possano anche influenzare la produzione delle micotossine associate alle singole specie. È molto importante, dunque, conoscere la diffusione delle singole specie anche durante ogni singola fase di sviluppo del frumento, poiché è stato dimostrato che le diverse condizioni ambientali nelle diverse fasi fenologiche possono determinare una evoluzione del profilo delle specie di *Fusarium* presenti in ogni singola fase, con conseguente cambiamento del rischio micotossicologico collegato (Xu et al., 2005). Alla luce di quanto riportato finora, appare evidente come sia essenziale capire l'esatta natura della FSF, attraverso una identificazione accurata delle specie coinvolte, della loro epidemiologia e delle loro "esigenze" ambientali, sia per una previsione e gestione più affidabile della malattia, sia per la gestione dei rischi alimentari connessi alla contaminazione da micotossine del frumento.

Occorre, infine sottolineare come la presenza negli alimenti a base cerealicola di micotossine da *Fusarium* considerate più dannose dall'Unione Europea, sono regolate dal Regolamento CE N. 1126/2007 del 28 settembre 2007 (tab. 1).

*I tricoteceni.* I tricoteceni sono le micotossine prodotte da *Fusarium* che causano maggiori preoccupazioni nella catena alimentare legata al frumento, a causa della loro presenza nelle piante già in campo come contaminanti naturali e del loro forte impatto sulla salute umana e animale in quanto sono potenti inibitori della sintesi proteica (McLaughlin et al., 1977). Costituiscono una famiglia di più di sessanta metaboliti sesquiterpenoidi prodotti da diversi generi di funghi come metaboliti secondari, il cui scheletro è costituito dal farnesilpirofosfato (FPP). Fino a oggi sono stati descritti più di 200 tricoteceni (Grovey, 2007), che possono essere suddivisi in 4 gruppi in base alla loro struttura chimica. I tricoteceni di tipo A hanno una catena laterale di idrogeno o estere presso l'atomo di carbonio 8 (C-8) e fra le micotossine più importanti annoverano tossina T-2 (T-2), tossina HT-2 (HT-2), 4,15-diacetossiscirpenolo (DAS) e neosolaniolo (NEOS); i tricoteceni di tipo B hanno un chetone in C-8 e fra le micotossine più importanti di questo gruppo ci sono deossinivalenolo (DON), nivalenolo (NIV), e i loro derivati acetilati.

PRODOTTO	LIVELLI MASSIMI (µG/KG)		
	DON	ZEА	T-2 + HT-2
Cereali non processati diversi da frumento duro, avena e mais	1250	100	
Frumento duro e avena	1750	100	100*
Mais non processato	1750	350	
Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca, germe	750	75	
Pasta (secca)	750	-	
Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione	500	50	
Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto	-	100	
Cereali da colazione e merende a base di granoturco	-	100	
Alimenti a base di cereali trasformati e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200	20	
Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni > 500 micron, non destinati al consumo umano diretto	750	200	
Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni ≤ 500 micron, non destinati al consumo umano diretto	1250	300	
* = valori ancora in discussione a livello di Commissione Europea			

Tab. 1 Valori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine nei cereali e nei prodotti a base di cereali secondo Regolamento CE N. 1126/2007 del 28 settembre 2007

Entrambi i tipi A e B di tricoteceni sono prodotti da specie del genere *Fusarium*. I tricoteceni di tipo C (ulteriore epossido in 7 e 8) e quelli di tipo D (anello macrociclico strutturalmente diverso tra C-4 e C-15) non sono prodotti da *Fusarium* (Ueno, 1984).

I tricoteceni di tipo A e B mostrano entrambi tossicità acuta nei confronti di uomini e animali, provocando vomito e rifiuto del cibo, mentre i tricoteceni di tipo B sono implicati maggiormente rispetto agli altri anche in tossicosi croniche, con rischi di determinare col tempo emorragie estese e compromissioni del sistema immunitario (Desjardins, 2006). Inoltre, questi composti, potrebbero essere anche fattori di virulenza durante i processi infettivi della pianta di frumento da parte dei funghi produttori (Desjardins, 2006).

Tra i tricoteceni di tipo A, la T-2 è una delle micotossine più tossiche. È prodotta principalmente da *F. sporotrichoides* e *F. langsethiae*, due agenti patogeni del frumento che si sviluppano comunemente in ambienti caratterizzati da clima freddo. La malattia associata al consumo di cereali altamente contaminati da T-2 include nausea, vomito, lesioni necrotiche a carico di bocca e gola (il che rende difficile l'alimentazione), grave diarrea emorragica ed emorragie in molti organi del corpo. La T-2 è anche un potente immuno-

soppressore, perché provoca danni irreversibili al midollo osseo, portando a una riduzione dei globuli bianchi (leucopenia).

Tra i tricoteceni di tipo B, il DON è molto più comune della tossina T-2 nei cereali, e quindi nei frumenti. È prodotto principalmente da *F. graminearum* e *F. culmorum*, due fra i più importanti agenti causali della fusariosi nel frumento. DON è anche conosciuto come vomitotossina a causa delle sue potenti proprietà emetiche e della sua azione come fattore di rifiuto del cibo. Anche se molto meno tossica della T-2, il DON può avere un effetto biologico anche a concentrazioni molto basse. Ci sono stati casi in Asia di malattie negli esseri umani, come vomito, nausea, vertigini e mal di testa, associate al consumo di cereali contaminati da DON e probabilmente da concentrazioni molto più basse di altri tricoteceni.

La fitotossicità acuta dei tricoteceni e la loro presenza nei tessuti vegetali suggeriscono, inoltre, che tali micotossine svolgano un ruolo nella patogenesi delle specie di *Fusarium* che li producono. Diversi gruppi di lavoro hanno studiato il ruolo dei tricoteceni in una serie di malattie delle piante creando mutanti non produttori di tricoteceni. Per esempio, la biosintesi del DON è stata bloccata producendo la rottura del gene *Tri5* in *F. graminearum*. La virulenza di due mutanti non produttori di tricoteceni è risultata significativamente ridotta nei test in camera di crescita su piantine di frumento rispetto ai loro parentali produttori nella capacità di determinare l'insorgenza dei sintomi FSF. Questa prova conferma che i tricoteceni sono probabili fattori di virulenza nella fusariosi del frumento (Desjardins e Plattner, 2003).

*Via biosintetica dei tricoteceni.* Lo scheletro dei tricoteceni è costituito dal FPP, che è sintetizzato a partire da isopentenilpirofosfato (IPP) e dal suo isomero dimetilallilpirofosfato. La ciclizzazione di FPP fornisce il primo intermedio della catena biosintetica, il tricodiene (TDN). Il TDN subisce poi successivi gradi di ossigenazione, portando alla sintesi di isotricotolo e di altri isomeri tetra ossigenati del TDN. Dopo un secondo grado di ciclizzazione, si forma isotricodermolo, da cui viene sintetizzata calonectrina (CAL). Infine, a partire da CAL si può osservare la sintesi di DON e derivati acetilati (3A-DON e 15A-DON) o di NIV (Kimura et al., 2007).

Almeno metà dei geni richiesti per la sintesi dei tricoteceni sono riuniti nel “*Tri cluster*”, di circa 25 kb (fig. 1), comprendente sequenze geniche, quali i geni *Tri4* e *Tri5*, essenziali per la biosintesi della struttura base dei tricoteceni. Geni fiancheggiati, quali *Tri3* e *Tri13*, sono invece responsabili delle differenze strutturali dei diversi profili micotossigeni. Un'altra peculiarità del “*Tri cluster*” è che la ricombinazione tra geni posti alle estremità del cluster è fortemente repressa, mentre avviene tra i geni centrali, codificanti per enzimi base



Fig. 1 *Cluster genico principale dei tricoteceni*

del pattern biosintetico. *Tri5* codifica infatti per la tricotidene sintasi, enzima responsabile del primo “step” di ciclizzazione (Hohn e Beremand, 1989). *Tri4* codifica invece per una citocromo P450 monoossigenasi (Hohn et al., 1995). I geni posti alle estremità del cluster sono invece correlati al chemiotipo, quali *Tri3*, che codifica per la 15-O-acetyltransferasi (McCormick et al., 1996) e che determina verosimilmente il chemiotipo 15ADON, o *Tri13*, codificante per una ossigenasi che porta al chemiotipo NIV (Lee et al., 2002). In tutti i chemiotipi, il gene *Tri5* è fiancheggiato da geni a funzione regolativa, quali *Tri6* e *Tri10*. *Tri6* è una *Cys2-His2 zinc-finger protein* coinvolta nella attivazione trascrizionale dei geni biosintetici sia presenti entro il cluster che al di fuori (Proctor et al., 1999; Tag et al., 2001). In particolare, *Tri6* si lega alla sequenza TNAGGCCT presente nel promotore di almeno dieci geni della catena di biosintesi (McCormick et al., 2004). *Tri 10* sembra inoltre agire a valle di *Tri6* (Tag et al., 2001) nel regolare positivamente i livelli biosintetici dei tricoteceni, ma anche degli isoprenoidi. Altri geni ancora, quali *Tri1* (codificante per citocromo P450) e *Tri101* (codificante una tricotecene 3-O-acetyltransferasi) sono stati identificati in posizioni lontane rispetto al cluster (Kimura et al., 2007).

#### SPECIE PRODUTTRICI DI TRICOTECENI DI TIPO B

Tra le specie che producono i tricoteceni di tipo B, diversi studi, effettuati soprattutto su *F. graminearum* e *F. culmorum*, hanno dimostrato che molti ceppi di queste due specie possono produrre un diverso spettro di tricoteceni B, in particolare DON e NIV e i loro derivati acetilati, 3-acetil-DON (3A-DON) e 15-acetil-DON (15A-DON), dando a una potenziale ampia varietà di chemiotipi. Sono stati descritti tre chemiotipi principali: chemiotipo NIV caratteristico di ceppi che producono NIV e 4-acetil-NIV (4A-NIV); chemiotipo 3A-DON con produttori di DON e 3A-DON; e chemiotipo 15A-DON con ceppi che producono DON e 15A-DON. Inoltre, alcuni ceppi sono stati riportati come produttori sia di DON sia di NIV, e sono stati descritti come chemiotipi sconosciuti (Ward et al., 2002). La presenza

SEQUENZA 5'-3'	DIMENSIONE DELL'AMPLICONE (bp)		RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
	CHEMIOTIPO NIV	CHEMIOTIPO DON	
Primer Forward TCGGTGGCAATATCTTCTTCTA Primer Reverse TGTGGAAGCGCGAGA	436	458-535	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward TGCCTGGCAATATCTTCTTCTA Primer Reverse TGCTATAATTTGTGCTAAATTTGTC		381-445	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward TGCCTGGCAATATCTTCTTCTA Primer Reverse GGTTCAGTAACGTTTCGACAATAG	465		Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward CGCCAATGCCGAGC Primer Reverse TGTGGAAGCGCGAGA	327	349-426	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward GGGCGAGGTGGYACTCTCAA Primer Reverse CCGCTCTTCTCTCTCCATCTC	3670	1273	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward TGGATGAATGACTTGAGTTGACA Primer Reverse AAAGCCTTCATTCACAGCC		483	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward CATCATGAGACTTGTKRAGTTTGGG Primer Reverse GCTAGATCGAATTTTGCAATTGAG		282	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward CCAATCCGAAACCGCAG Primer Reverse TTGAAAGCTCCAATGTCGTG	312		Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward CATCATGAGACTTGTKRAGTTTGGG Primer Reverse TTGAAAGCTCCAATGTCGTG	1075	799	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward CAACCTGCTGCTGGCTGAG Primer Reverse CATAAAGGCCGTTGTTGAGAC	4051	3775	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward ACTTTCCACCCGAGTAATTT Primer Reverse CAAAACCTGTTGTTCCACTGCC		525	Quarra A., Mira G., Haidukowski M., Logneco A., Mulè G., Visconti A. (2006), «FEMS Microbiol Lett», 259, pp. 7-13
Primer Forward CATCATACTCGCTCTGCTG Primer Reverse TT(AG)TAGTTTGCATCAATT(AG)TAG		708	Quarra A., Mira G., Haidukowski M., Santino A., Mulè G., Visconti A. (2005), «Food Add Contam.», 22, pp. 309-315
Primer Forward GCAITGGCTAACACAATGA Primer Reverse TT(AG)TAGTTTGCATCAATT(AG)TAG		354	Quarra A., Mira G., Haidukowski M., Santino A., Mulè G., Visconti A. (2005), «Food Add Contam.», 22, pp. 309-315
Primer Forward ATCGTGACAGGTTTACG Primer Reverse TTCAAGTCAACGTTTCGACAAI	625		Quarra A., Mira G., Haidukowski M., Santino A., Mulè G., Visconti A. (2005), «Food Add Contam.», 22, pp. 309-315
Primer Forward GCCGTGGGGRTAAAGTCAAA Primer Reverse TGACAAGTCCGGTCCACTAGCA	360	300	Li H.P., Wu A.B., Zhao C.S., Scholten O., Löffler H., Liao Y.C. (2005), «FEMS Microbiol Lett», 243, pp. 505-511
Primer Forward GGCCTTACGACTCCCTCAACAATGG Primer Reverse AGAGCCCTGCGAAAG(C/T)ACTGGTGC	160	173-327	Lee T., Oh D.W., Kim H.S., Lee J., Kim Y.H., Yun S.H., Lee Y.W. (2001), «Appl Env Microbiol», 67 (7), pp. 2966-2972
Primer Forward CTTGTTAAGCTAAGCGTTTTT Primer Reverse AACCCCTTTCCTATGTGTTA		200	Bakan B., Giraud-Delville C., Pinson L., Richard-Molard D., Fournier E., Brygoo Y. (2002), «Appl Env Microbiol», 68 (1), pp. 5472-5479

Tab. 2. Si riportano i riferimenti bibliografici e informazioni metodologiche (sequenza dei primer e dimensioni attese degli ampliconi) relativamente a sistemi analitici PCR per la caratterizzazione del chemiotipo in *Fusaria micotossigeni*



di questi chemiotipi all'interno di una stessa specie è legata ai polimorfismi riscontrati nel "Tri cluster" e potrebbe essere legata alla pressione selettiva dei diversi ambienti colonizzati dalle specie produttrici di tricoteceni B (Ward et al., 2002). Distinguere tra diversi chemiotipi è importante, perché le differenze nello schema di idrossilazione e acetilazione dei tricoteceni possono comportare notevoli differenze nella tossicità e nell'attività biologica (Kimura et al., 1998). Infatti, è stato dimostrato come il chemiotipo 3A-DON sia più tossico rispetto al chemiotipo 15A-DON in esperimenti su cavia e in genere produca più alte quantità di micotossine (Ward et al., 2008). D'altro canto, i lavori di Carter et al. (2002) e di Cumagun et al. (2004) indicano che i ceppi di *Fusarium* produttori di DON sono più aggressivi rispetto a quelli produttori di NIV su frumento, mentre la situazione si inverte su mais, suggerendo perciò come il chemiotipo sia legato all'aggressività e alla "fitness" del ceppo in relazione all'ospite.

L'avanzamento degli studi genetici e molecolari aventi come oggetto il pathway biosintetico dei tricoteceni in *Fusarium* e la conseguente conoscenza delle sequenze geniche coinvolte nella loro sintesi (Kimura et al., 2007) hanno permesso di sviluppare sistemi di tracciabilità molecolare per la caratterizzazione chemiotipica dei ceppi di *Fusarium*. In tabella 2 si riportano alcuni dei lavori più significativi riguardanti l'identificazione del chemiotipo all'interno delle specie di *Fusarium* produttrici di tricoteceni B.

Infine, la rivalutazione tassonomica di *F. graminearum* eseguita negli ultimi dieci anni, aumenta l'importanza di chiarire le relazioni tra i chemiotipi e nuove specie descritte all'interno della specie complessa *F. graminearum*, a livello sia chimico sia molecolare.

#### IL COMPLESSO DI SPECIE DI *F. GRAMINEARUM* (FGC)

La recente riclassificazione di *F. graminearum*, anche se controversa, necessita di un approccio alla tassonomia e all'identificazione di questa specie più attento rispetto al passato, dal momento che molti studiosi considerano *F. graminearum* come un complesso di specie. Negli ultimi anni, studi basati su polimorfismi di sequenza di DNA di undici geni nucleari e tre regioni intergeniche sono stati condotti da O'Donnell e collaboratori (O'Donnell et al., 2000; 2004), conducendo alla descrizione di undici specie all'interno di *F. graminearum*, definita come un complesso di specie (FGC). In seguito a ulteriori analisi filogenetiche su dati di sequenze multigeniche del DNA di 13 geni, Starkey e collaboratori (Starkey et al., 2007) hanno descritto due nuove specie all'interno del FGC,

mentre, più recentemente, Yli-Mattila e collaboratori (2009) hanno descritto *F. ussurianum*, agente patogeno del frumento nell'estremo oriente della Russia, considerato componente del nuovo gruppo asiatico nel FGC. Tuttavia, non tutti i ricercatori che lavorano su *Fusarium* sono d'accordo con la divisione di *F. graminearum* in specie diverse. Alcuni autori ritengono che nel FGC vi sono sottospecie, piuttosto che specie (Leslie e Summerell, 2006). Questa opinione è supportata dalla constatazione che, in generale, isolati di specie filogenetiche inter-fertili tendono ad avere un similarità di bande AFLP dell'ordine del 40-65%, e che *F. asiaticum* e *F. graminearum sensu stricto*, due membri del FGC, hanno similarità di bande AFLP pari a circa il 50%. Inoltre, solo tre delle specie ipotizzate mostrano caratteristiche morfologiche dei conidi utili nella loro differenziazione, e non c'è correlazione tra i lignaggi e gli specifici profili micotosigenici (Leslie et al., 2001; O'Donnell et al., 2000; 2004). Infine, in seguito al sequenziamento parziale del gene *Tri101* di 400 ceppi del FGC, Leslie e collaboratori (Leslie et al., 2007) hanno generato dati filogenetici che hanno portato gli autori a definire chiaramente che "vi è solo una singola specie in *F. graminearum*/*G. zeae*". Sono, dunque necessari ulteriori studi per determinare se all'interno di *F. graminearum* bisogna considerare l'esistenza di specie distinte filogenetiche o soltanto lignaggi subspecifici.

#### CHEMIOTIPI E FILOGENESI DI *F. GRAMINEARUM* IN ITALIA

Un gruppo di 64 ceppi appartenenti al FGC isolati da cereali in Italia, è stato analizzato per individuare il loro chemiotipo chimico e molecolare (Desjardins, 2008) e le loro caratteristiche filogenetiche. I ceppi sono stati ottenuti dalla collezione fungina dell'ISPA-CNR, Bari ([www.ispa.cnr.it/Collection](http://www.ispa.cnr.it/Collection)). Le analisi filogenetiche sono state basate su analisi di sequenza dei seguenti geni: fattore di allungamento della traduzione,  $\beta$ -tubulina, e istone 3. I frammenti amplificati, compresi tra le coppie di primer EF 1/2 (O'Donnell et al., 2000), T 1/22 (O'Donnell e Cigelnik, 1997) e H3-1a/1b (Glass e Donaldson, 1995), di 600, 1200 e 600 bp, rispettivamente, sono stati marcati a fluorescenza e sequenziati. Le sequenze derivate sono state allineate e confrontate a quelle depositate nei database di sequenza, corrispondenti ai ceppi utilizzati per definire i lignaggi all'interno di FGC (O'Donnell et al., 2000; 2004; Starkey et al., 2007; Ward et al., 2002).

I chemiotipi molecolari sono stati determinati attraverso PCR multiplex per determinare la capacità dei ceppi di produrre tricoteceni tipo-DON o tipo-NIV e 3A-DON o 15A-DON. Una prima analisi, effettuata con pri-

mer le cui sequenze erano basate su variazioni della sequenza nei geni *Tri5* e *Tri7*, è servita per distinguere i potenziali chemiotipi DON dai NIV, come descritto da Quarta e collaboratori (Quarta et al., 2005; 2006). Una seconda analisi, le cui sequenze dei primer erano basate su variazioni di sequenza nel gene *Tri3*, ha permesso di distinguere i ceppi potenziali produttori di 3A-DON dai 15A-DON (Quarta et al., 2006). Infine, il profilo micotossigenico per ogni ceppo è stato analizzato utilizzando il metodo della cromatografia liquida a elevato rendimento (HPLC).

Le indagini filogenetiche hanno mostrato l'appartenenza di tutti i ceppi analizzati a *F. graminearum sensu stricto*, eccetto due ceppi identificati come *F. cortadaeriae*. Il chemiotipo maggiormente presente è risultato 15A-DON. Sono stati rilevati anche chemiotipi DON e NIV, ma a bassi livelli, mentre un solo ceppo si è dimostrato produttore di 3A-DON. Questi dati dimostrano che la struttura genetica della popolazione italiana di FGC analizzata è omogenea sebbene possa presentare al proprio interno una piccola variabilità di chemiotipica. Inoltre, i dati ottenuti possono fornire indicazioni preziose ai fini di una gestione più efficace della malattia, e per mettere a punto un programma di miglioramento genetico che sviluppi strategie di difesa adeguate. Infine, la conoscenza della struttura genetica e chemiotipica di una popolazione di FGC permette anche una migliore comprensione dell'ecologia, dell'epidemiologia e della dinamica delle popolazioni presenti all'interno del FGC in un dato territorio.

#### SPECIE PRODUTTRICI DI TRICOTECENI DI TIPO A

Tra le specie di *Fusarium* citate in letteratura in grado di produrre tricoteceni di tipo A, diversi studi individuano principalmente in *F. langsethiae* e *F. sporotrichioides* le specie principalmente coinvolte nell'accumulo di tali micotossine nel frumento. In particolare, tali specie vengono considerate come le principali produttrici di T-2 e HT-2 (le micotossine più tossiche fra i tricoteceni) contaminanti naturalmente il frumento, soprattutto nel Nord Europa (Edwards, 2009). A queste specie viene aggiunta spesso anche *F. poae*, sulla quale, tuttavia, esistono molti dati contraddittori in quanto, sebbene tale specie venga considerata produttrice di alcuni dei tricoteceni di tipo A più noti quali DAS e NEOS, molti report, invece, indicano che *F. poae* non sia in grado di produrre T-2 e HT-2 (Somma et al., 2010). Stabilire con esattezza il profilo micotossigenico che attiene a ciascuna di queste specie è importantissimo per due ragioni principali: la prima è che una corretta valutazione di tale poten-

zialità fornirebbe utilissime indicazioni sul rischio micotossicologico reale che si corre in seguito alla diffusione di una data specie sul frumento; la seconda risiede nel fatto che, come precedentemente sottolineato, la contaminazione di T-2 e HT-2 nelle cariossidi di frumento e nei prodotti derivati sta per essere regolata a livello Europeo e quindi è necessaria una grande attenzione nella corretta identificazione delle specie produttrici di queste due micotossine.

A rendere più complessa l'esigenza di chiarire con estrema precisione il profilo micotossigeno di queste specie, è la confusione tassonomica che riguardava *F. poae* fino a pochissimi anni orsono, in quanto tale specie comprendeva anche *F. langsethiae*, descritta formalmente dal punto di vista morfologico solo recentemente da Torp e Nirenberg (2004), e precedentemente definita come *F. poae* "polveroso" (Torp e Langseth, 1999). Approfonditi studi di filogenesi hanno confermato la distinzione di *F. langsethiae* rispetto a *F. poae* (Yli-Mattila et al., 2004), mentre studi sulla produzione di micotossine da parte di popolazioni appartenenti alle due specie hanno dimostrato una profonda differenza nel profilo micotossigeno delle due specie con *F. langsethiae* considerata l'unica in grado di produrre T-2 e HT-2 (Thrane et al., 2004).

Infine, bisogna considerare che entrambe queste specie, *F. langsethiae* e *F. poae*, sono morfologicamente molto vicine a *F. sporotrichioides*, altra specie nota come produttrice di T-2 e HT-2 e la cui diffusione su frumento, sebbene confinata in ambienti dell'Europa Settentrionale, caratterizzati da un clima estremamente rigido (Yli-Mattila et al., 2008), viene segnalata sporadicamente anche in ambienti caratterizzati da un clima secco e caldo come l'Italia Meridionale (Logrieco e Moretti et al., 2008). In aggiunta, anche *F. poae* e *F. langsethiae*, vengono frequentemente segnalati oltre che nel Nord Europa, in ambienti Meridionali (Logrieco e Moretti, 2008). Se questa capacità di adattamento ad ambienti così diversi significhi che all'interno di queste specie si stiano sviluppando popolazioni in grado di variare geneticamente per poter colonizzare nuovi areali di diffusione, rappresenta una sfida interessante per future ricerche.

#### SPECIE DI *FUSARIUM* PRODUTTRICI DI ENNIATINE COINVOLTE NELLA FSF

Nell'ultima decade, in Europa sono stati segnalati in misura crescente, come contaminanti del frumento, i ciclodepsipeptidi, in particolare, enniatine e beauvericina (Logrieco et al., 2008), metaboliti tossici prodotti da alcune specie di *Fusarium* comunemente diffuse nel complesso di specie coinvolte nella FSF quali *F. avenaceum*, *F. poae* e *F. tricinctum* (Desjardins, 2006). Le

enniatine sono sostanze note come fitotossine da lungo tempo, in quanto in grado di determinare necrosi in diversi tipi di pianta (Gäumann et al., 1960). D'altro canto, anche la beauvericina ha dimostrato recentemente proprietà fitotossiche molto elevate nei confronti di protoplasti di pomodoro e di piantine della stessa coltura (Paciolla et al., 2004; 2008). Tuttavia, la preoccupazione derivante da enniatine e beauvericina è dovuta alla loro capacità di determinare effetti tossici su molti sistemi biologici animali (Logrieco et al., 2002). Infatti, a seguito della loro struttura ionoforica, tali metaboliti possono causare l'alterazione del trasporto ionico attraverso la membrana cellulare, attività che potrebbe condurre alla distruzione della selettività cationica della parete cellulare e, infine, indurre frammentazione del DNA e morte cellulare via apoptosi (Logrieco et al., 2004). Tale meccanismo di azione sembra essere alla base di un ampio spettro di attività cito-tossica nei confronti di linee cellulari di origine umana e animale (Calò et al., 2004; Lee et al., 2008) e induce a pensare che la contaminazione delle cariossidi di frumento da parte di enniatine e beauvericina, riportata da numerosi ricercatori (Logrieco et al., 2008), può rappresentare un'ulteriore fonte di preoccupazione per il consumo di frumento contaminato in campo da *Fusarium* coinvolti nella FSF.

#### LA PREVENZIONE ATTRAVERSO IL MONITORAGGIO A LIVELLO NAZIONALE E REGIONALE

Un approccio possibile per il controllo del problema legato alla contaminazione da micotossine nel frumento è un monitoraggio costante. A questo proposito, a livello europeo, recenti indagini di monitoraggio del territorio per la diffusione di specie di *Fusarium* hanno coinvolto i Paesi Bassi (Waalwijk et al., 2004) e diversi Paesi dell'Europa orientale, tra cui la Finlandia e la Russia (Yli-Mattila et al., 2004). Anche in Italia sono a oggi attivi progetti di monitoraggio dell'incidenza di *Fusaria* su scala regionale (Delogu et al., 2005; Rossi et al., 2006) e nazionale. A questo proposito, il progetto regionale "Fusariosi e micotossine", attraverso una duplice azione di monitoraggio del territorio regionale per presenza di micotossine in cereali a paglia e di prove "on farm", ha permesso di elaborare un prototipo di modello previsionale (FHB-DSS), in grado di definire il rischio della presenza di micotossine nelle principali specie cerealicole presenti nella regione Emilia-Romagna sulla base delle condizioni meteorologiche, delle caratteristiche della zona di coltivazione, della suscettibilità varietale e delle tecniche agronomiche utilizzate (Delogu et al., 2005). Analogamente, il sistema Qualimetre (<http://www.syngenta>.

com/en/corporate\_responsibility/integrated\_cropest\_management.html), sviluppato da Syngenta sulla base dei dati raccolti da oltre 18.000 parcelle sperimentali di cereali a paglia, consente di fare previsioni sui livelli di micotossine in zone a vocazione cerealicola di Francia e Belgio, mentre il modello DONcast ha trovato applicazione in Canada (Hooker et al, 2002).

Le azioni di monitoraggio promosse dai diversi progetti regionali, nazionali ed europei sono state supportate dal parallelo sviluppo di metodiche analitiche efficienti. Metodiche classiche per la quantificazione dell'incidenza di FSF includono innanzitutto la valutazione visiva dei sintomi sulle spighe e sulla granella a raccolta (Hilton et al., 1999; Lacey et al., 1999). Questi approcci forniscono una stima dei sintomi della malattia fungina e quantificano quindi in modo indiretto la popolazione fungina presente. Al contrario, metodiche basate sulla conta delle cariossidi infette (Henriksen e Elen, 2005) forniscono informazioni quantitative sulla popolazione fungina esistente, ma richiedono tempi lunghi di analisi e un alto grado di expertise per la classificazione tassonomica dei funghi. I metodi analitici "diretti", basati sull'uso di GC-MS, HPLC, TLC, NIR e saggi immunologici ELISA, determinano invece direttamente la quantità di micotossina presente. Le diverse metodiche presentano vantaggi e svantaggi peculiari, quali ad esempio l'alto costo e l'alta affidabilità delle tecnologie basate su HPLC e GC-MS, la semplicità d'analisi e il basso costo dell'approccio ELISA, la rapidità affiancata però da bassa affidabilità della metodica NIR.

#### LA TRACCIABILITÀ MOLECOLARE

Fondamentale per lo sviluppo di metodiche di tracciabilità molecolari efficienti, è stato l'avanzamento degli studi genetici e molecolari aventi come oggetto il pathway biosintetico dei tricoteceni in *Fusarium* (Kimura et al., 2007). Infatti, partendo da alcune sequenze geniche coinvolte nella loro sintesi, si sono potuti sviluppare sistemi di tracciabilità molecolare delle specie di *Fusarium* produttrici di tricoteceni. A questo riguardo, diversi sistemi analitici basati su PCR *end point* e *real time* sono stati pubblicati. In tabella 3 sono riportati lavori focalizzati sull'identificazione di *Fusarium* micotossigenici applicabili a campioni di granella.

In particolare, l'approccio analitico qPCR sviluppato da Terzi et al. (2007) si è dimostrato applicabile a una varietà di campioni provenienti da diverse filiere. Il sistema è stato infatti validato su diversi cereali, provenienti da ambienti geografici diversi e caratterizzati da alta variabilità nel tenore di

SPECIE FUN- GINA	SEQUENZA 5'-3'	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward TCACCCAGACGGGAATGA Primer Reverse GAAGCTGCGCTCAAGCTT probe CACTTGGATATTTCC	Waalwijk C., van der Heide R., de Vries I., van der Lee T., Schoen C., Costel-de Corainville G., Hausen-Hahn I., Kastelein P., Kohl J., Lonnet P., Demarquet T., Kema G.H.J. (2004), «Eur J Plant Pathol», 110, pp. 481-494
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward ATGGTGAACCTCGTCTGGC Primer Reverse CCCTTCTTACGCCAATCTTCG	Nicholson P., Simpson D.R., Weston G., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W., Joyce D. (1998), «Physiol Mol Plant Pathol», 53, pp. 17-37
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward GATGCCAGACCAAGACGAAG Primer Reverse GATGCCAGACGCACTAAGAT	Demeke T., Clear R.M., Patrick S.K., Gaba D. (2005), «Int J Food Microbiol», 103, pp. 271-284
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward TTCACTAGATCGTCCGGCAG Primer Reverse GAGCCCTCCAAGCGAGAAG probe AAAGAAGTTGCAATGTTAGTG	Schilling A.G., Moller E.M., Geiger H.H. (1996), «Phytopathol», 86, pp. 515-522
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward GTACCAGAGCAC GGC GTTG Primer Reverse TCCTCTCGATCAAAAGAAAG probe ACAAGTCCCTCGACGTG	Brandfass C., Karlovsky (2006), «BMC Microbiology», 6, p. 4 doi:10.1186/1471-2180/6/4
<i>Fgraminearum</i>	Primer Forward GGCGCTTCTCGTGAACACA Primer Reverse GGCTAAACAGCACGAATGC probe AGATATGTCCTTCAAGTCT	Leisova L., Kucera L., Chrpova J., Sykorova S., Sip V., Ovesna J. (2006), «J Phytopathol», 154, pp. 603-611
<i>Fgraminearum</i>	Primer Forward CTCGGGATATGTTGCGTCAA Primer Reverse GGTAGGTATCCGACATGGCAA	Leisova L., Kucera L., Chrpova J., Sykorova S., Sip V., Ovesna J. (2006), «J Phytopathol», 154, pp. 603-611
<i>Fgraminearum</i>	Primer Forward GGTCCTCGACAGCAATGGTGTT Primer Reverse GCCTGTGTTTTCGTGGCAGT probe ACAAGGGCACCTCTGAGCTCCAGC	Waalwijk C., van der Heide R., de Vries I., van der Lee T., Schoen C., Costel-de Corainville G., Hausen-Hahn I., Kastelein P., Kohl J., Lonnet P., Demarquet T., Kema G.H.J. (2004), «Eur J Plant Pathol», 110, pp. 481-494
<i>Fgraminearum</i>	Primer Forward AGGGACATAAGTGCAGA Primer Reverse ACTGTGCACTGTCGCAAGTG	Nicholson P., Simpson D.R., Weston G., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W., Joyce D. (1998), «Physiol Mol Plant Pathol», 53, pp. 17-37
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward CAAAAGCTTCCGAGTGTGTC Primer Reverse GGCGAAGGTTCAAGGATGAC	Brandfass C., Karlovsky (2006), «BMC Microbiology», 6, p. 4 doi:10.1186/1471-2180/6/4
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward AATATGAAAACGGAGTTCACTACA Primer Reverse ATTGCGGTGCTCAAAAGT	Demeke T., Clear R.M., Patrick S.K., Gaba D. (2005), «Int J Food Microbiol», 103, pp. 271-284
<i>Fusarium spp.</i>	Primer Forward GCTGCTCATCATTTTGCTCAG Primer Reverse CTGATCTGGTCAACGCTCATC	Reischer G.H., Lemmens M., Farnleitner A., Adler A., Mach R.L. (2004), 59 (1), pp. 141-146
<i>Fusarium spp.</i>	Primer Forward TGAATTACATGGAGGCCGAATCTCA Primer Reverse TTCGAATGTTGTTGATTCATAGTCGTT probe TTGCCCCCTTTTGATCGAGTTGCGTCTCCC	Niessen L., Vogel R.F. (1997), «Syst Appl Microbiol», 20, pp. 111-123
		Niessen L., Kucera L., Chrpova J., Sykorova S., Sip V., Ovesna J. (2006), «J Phytopathol», 154, pp. 603-611
		Terzi V., Morcia C., Faccioli P., Faccini N., Rossi V., Cigolini M., Corbellini M., Scudellari D., Delogu G. (2007), «Int. J Food Sci Technol», 42, pp. 1390-1396
		Niessen L., Vogel R.F. (1997), «Syst Appl Microbiol», 21, pp. 618-631
		Schnerr H., Niessen L., Vogel R.F. (2001), «Int Jf Food Microbio», 71, pp. 53-61
		Bluhm B.H., Cousin M.A., Woloshuk (2004), «J Food Protect», 67 (3), pp. 536-543

Tab. 3. Diversi sistemi analitici basati su PCR e qPCR sono disponibili per l'identificazione e quantificazione di *Fusaria micotosigeni*. In tabella sono riportati i riferimenti bibliografici e le sequenze dei primer

contaminazione. Inoltre, l'approccio di qPCR sviluppato si è dimostrato un efficace strumento per rilevare precocemente la presenza di funghi micotossigeni prima della comparsa di sintomi visibili sulla pianta. L'utilità del sistema è perciò da riferire da una parte al potenziamento dei test analitici ufficiali; dall'altra alla possibilità di operare una diagnosi estremamente precoce, in campo, a stadi fenologici in cui le classiche procedure di rilievo dei sintomi sono inefficaci (Rossi et al., 2007).

Il sistema analitico sviluppato è stato applicato anche a campioni provenienti dalla filiera di produzione di cereali maltati, allo scopo di verificare l'applicabilità del sistema d'analisi e per seguire l'eventuale abbattimento/incremento di DNA fungino e DON durante il processo della maltazione. A questo scopo sono stati selezionati campioni di granella di frumento tenero e frumento duro provenienti dalla rete di monitoraggio 2006 del progetto inter-regionale MICOCER. I campioni presi in considerazione avevano un tenore in micotossine al di sotto dei limiti di legge, ma comunque rilevabile. È stato quantificato il DNA fungino sia sui campioni di granella tal quale, sia dopo maltazione. I risultati, espressi come valori di cicli soglia o Ct, sono riportati nella figura 2. In tutti i campioni si evidenzia un incremento del valore di Ct dopo maltazione, indicativo di un abbattimento nel livello di DNA fungino. Poiché preliminarmente alla maltazione si esegue routinariamente una setacciatura, una possibile spiegazione dell'abbattimento della contaminazione può essere legata all'allontanamento dei semi striminziati, particolarmente attaccati dal fungo. Altri trattamenti fisici, legati allo molitura, sono di potenziale interesse per la riduzione del livello di contaminazione. In particolare la decorticazione e la perlatura si sono rivelate efficaci nella riduzione del tenore di DON in granella di frumento duro (Rios et al., 2009).

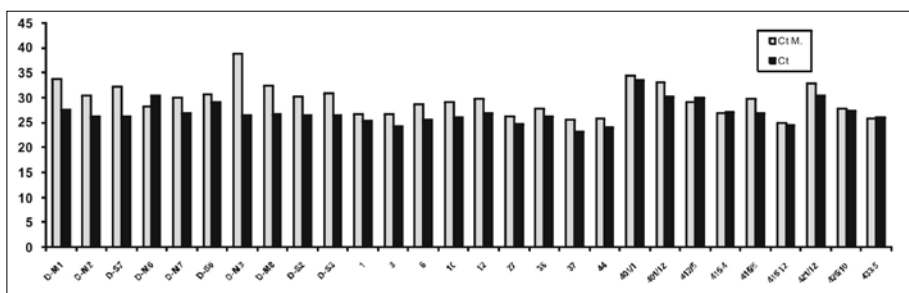


Fig. 2 valori di Ct dei campioni di frumento prima (barre scure) e dopo maltazione (barre chiare)



## RIASSUNTO

La fusariosi della spiga di frumento (FSF) è oggetto di crescente attenzione in tutto il mondo per l'impatto che la malattia può avere sulla riduzione del raccolto, sulla qualità delle cariossidi e sulla salute umana per la contaminazione da micotossine. Inoltre destano preoccupazione anche la diffusione di specie di *Fusarium* patogene e micotossine emergenti, e la grande variabilità inter- e intra-specifica che caratterizza numerose specie di *Fusarium* che fanno parte del complesso di specie che causano la FSF. La principale classe di micotossine prodotte dalle specie coinvolte è quella dei tricoteceni, potenti inibitori della sintesi proteica, che possono determinare, fra i vari effetti, anche forme molto serie di immuno-deficienza sia nell'uomo sia negli animali in allevamento. In base alla presenza o assenza di un gruppo chetonico in posizione C8, che conferisce una maggiore tossicità, i tricoteceni possono dividersi in tricoteceni A, fra i quali la tossina T-2 è sicuramente la micotossina dotata di maggiore tossicità, e i tricoteceni di tipo B, fra i quali la più nota è il deossinivalenolo, detto anche vomitossina, molto diffuso nelle cariossidi di frumento in tutto il mondo. L'Unione Europea ha stabilito dei livelli massimi di contaminazione delle derrate alimentari a base di frumento per diverse micotossine. È, dunque importantissimo, riuscire a contenere in campo le specie di *Fusarium* che le producono attraverso strategie di lotta appropriate. Tali strategie non possono non partire prima di tutto dalla corretta identificazione delle diverse specie di *Fusarium* coinvolte nella FSF, e quindi da una conoscenza profonda delle loro principali caratteristiche tossinogeniche, biologiche e genetiche. In questo lavoro, verrà fornita una illustrazione delle principali caratteristiche genetiche e tossinogeniche delle specie di *Fusarium* più importanti per la FSF e saranno illustrati i risultati di alcuni studi tesi a sviluppare strumenti molecolari per una diagnosi precoce delle specie di *Fusarium*, e ad analizzare la variabilità genetica intra-specifica di *F. graminearum*, la principale specie tossinogenica coinvolta nella FSF.

## ABSTRACT

Fusarium Head Blight (FHB) of wheat has been increasing its importance worldwide due to the impact that the disease can have on the yield reduction, kernel quality and human health because of the mycotoxin contamination. Moreover, emerging *Fusarium* pathogens and related mycotoxins and the wide genetic variability of several species involved in FHB are sources of further concern. The main class of mycotoxins produced by *Fusarium* on wheat are the trichothecenes, potent inhibitors of protein synthesis, than can cause severe deficiency of the immune system in both humans and animals. According with the presence or absence of a chetonic group in C8 of the trichothecene skeleton, these mycotoxins can be divided in trichothecene A, among which T-2 toxin is surely the mycotoxin provided of the highest toxicity, and trichothecene B, among which the most known is deoxynivalenol, that often occurs in the wheat kernels worldwide. The European Union has fixed severe tolerance levels of occurrence in wheat and wheat-based food for several *Fusarium* mycotoxins. Therefore it is extremely important to control in the field the *Fusarium* species that produce mycotoxins by using reliable control strategies. However, these strategies must be funded both on a correct identification of the different *Fusarium* species involved in the FHB and a knowledge of their main toxinogenic,

biological and genetic traits. In this paper, an overview of main genetic and toxinogenic traits of *Fusarium* species for FHB, will be provided. Moreover, the main results of studies carried out for the development of early detection methods of *Fusarium* species in the field and for the analyses of intra-specific genetic variability of *F. graminearum*, the main species involved in FHB, will be described.

## BIBLIOGRAFIA

- ABECASSIS J., FEILLET P. (2003): *Basis of knowledge on deoxynivalenol distribution in durum wheat, semolina and pasta products*, in D'Egidio M.G. (Ed.), *Proceedings of the Second International Workshop on Durum Wheat and Pasta Quality: Recent Achievements and New Trends*. MiPAF Cereals Experimental Institute, Rome, Italy, pp. 135-139.
- BECHTEL D.B., KALEIKAU L.A., GAINES R.L., SEITZ L.M. (1985): *The effects of Fusarium graminearum infection on wheat kernels*, «Cereal Chemistry», 62, pp. 191-197.
- CALÒ L., FORNELLI F., RAMIRES R., NENNA S., TURSI A., CAIAFFA M.F., MACCHIA L. (2004): *Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin*, «Pharmacological Research», 49, pp. 73-77.
- CARTER J.P., REZANOOR H.N., HOLDEN D., DESJARDINS A.E., PLATTNER R.D., NICHOLSON P. (2002): *Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of Fusarium graminearum*, «European Journal of Plant Pathology», 108, pp. 573-583.
- CAST – COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (2003): *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human system*. Council for Agricultural Science and Technology, Task Force Report No. 139, Ames, Iowa, USA, 199 pp.
- CUMAGUN C.J.R., BOWDEN R., JURGENSON J., LESLIE J., MIEDANER T. (2004): *Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of Gibberella zeae (Fusarium graminearum) toward wheat*, «Phytopathology», 94, pp. 520-526.
- DELOGU G., TERZI V., ROSSI V., CIGOLINI M., SCUDELLARI D. (2005): *Micotossine nei cereali, pronto un nuovo metodo per ridurre i rischi*, «Agricoltura», Luglio-Agosto, pp. 121-123.
- DESJARDINS A.E. (2006): *Fusarium mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology*, American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA.
- DESJARDINS A.E. (2008): *Natural Product Chemistry Meets Genetics: When is a Genotype a Chemotype?*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 56, pp. 7587-7592.
- Desjardins A.E., Plattner R.D. (2003): *Diverse traits for pathogen fitness in Gibberella zeae*, «Canadian Journal of Plant Pathology», 25, pp. 21-27.
- EDWARDS S., BARRIER-GUILLOT B., CLASEN P.E., HIETANIEMI V., PETERSSON H. (2009): *Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production*, «World Mycotoxin Journal», 2, pp. 173-179.
- GAUMANN E., NAEF-ROTH S.T., KERN H. (1960): *Zur phytotoxischen wirksamkeit der enniatine*, «Phytopathologische Zeitschrift», 40, pp. 45-51.
- GLASS N.L., DONALDSON G.C. (1995): *Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes*, «Applied and Environmental Microbiology», 61 (4), pp. 1323-1330.
- GOSWAMI R.S., KISTLER H.C. (2004): *Heading For Disaster: Fusarium graminearum on cereal crops*, «Molecular Plant Pathology», 5 (6), pp. 515-525.

- GROVEY J. F. (2007): *The trichothecenes and their biosynthesis*, «Fortschr. Chem. Org. Naturst.», 88, pp. 63-130.
- HENRIKSEN B., ELEN O. (2005): *Natural Fusarium grain infection level in wheat, barley and oat after early application of fungicides and herbicides*, «Journal of Phytopathology», 153, pp. 214-220.
- HILTON A.J., JENKINSON P., HOLLINS T.W., PARRY D.W. (1999): *Relationship between cultivar height and severity of Fusarium ear blight in wheat*, «Plant Pathology», 48, pp. 202-208.
- HOHN T.M., BEREMAND P.D. (1989): *Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus Fusarium sporotrichioides*, «Gene», 79, pp. 131-138.
- HOHN T.M., DESJARDINS A.E., MCCORMICK S.P. (1995): *The Tri4 gene of Fusarium sporotrichioides encodes a cytochrome P450 mono-oxygenase involved in trichothecene biosynthesis*, «Molecular General Genetics», 248, pp. 95-102.
- HOOKE D.C., SCHAAFSMA A.W. (2003): *The DONcast model: using weather variables pre and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat*, «Aspects of Applied Biology», 68 (17), pp. 117-122.
- JENNINGS P., COATES M.E., WALSH K., TURNER J.A., NICHOLSON P. (2004): *Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of Fusarium graminearum isolated from wheat crops in England and Wales*, «Plant Pathology», 53, pp. 643-652.
- KIMURA M., TOKAI T., TAKAHASHI-ANDO N., OHSATO S., FUJIMURA M. (2007): *Molecular and genetic studies of Fusarium trichothecene biosynthesis: pathways, genes and evolution*, «Bioscience, Biotechnology and Biochemistry», 71 (9), pp. 2105-2123.
- KIMURA M., KANEKO I., KOMIYAMA M., TAKATSUKI A., KOSHINO H., YONEYAMA K. AND YAMAGUCHI I. (1998): *Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of Tri101*, «Journal of Biological Chemistry», 273, pp. 1654-1661.
- LACEY J., BATEMAN G.L., MIROCHA C.J. (1999): *Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by Fusarium spp. in wheat*, «Annals of Applied Biology», 134, pp. 277-283.
- LEE T., HAN Y.-K., KIM K.-H., YUN S.-H., LEE Y.-W. (2002): *Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of Gibberella zeae*, «Applied and Environmental Microbiology», 68, pp. 2148-2154.
- LEE H.S., SONG H.H., JEONG J.H., SHIN C.G., CHOI S.U. AND C. LEE. (2008): *Cytotoxicity of enniatins H, I, and MK 1688 from Fusarium oxysporum KFCC 11363P*, «Toxicon», 51, pp. 1178-1185.
- LESLIE J.F., SUMMERELL B.A. (2006): *The Fusarium Laboratory manual*, Blackwell Publishing: Iowa, USA, pp. 388.
- LESLIE J.F., ZELLER K.A., SUMMERELL B.A. (2001): *Icebergs and species in populations of Fusarium*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 59, pp. 107-117.
- LESLIE J.F., ANDERSON L., BOWDEN R.L., LEE Y. (2007): *Inter- and intraspecific genetic variation in Fusarium*, «International Journal of Food Microbiology», 119, pp. 25-32.
- LOGRIECO A., MORETTI A., RITIENI A., CAIFFA, M.F., MACCHIA, L. (2002): *Beauvericin: Chemistry, Biology and Significance*, in *Advances in microbial toxin research and its biotechnological exploitation* (R.K. Upadhyay, ed.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 23-30.
- LOGRIECO A., MORETTI A. (2008): *Between emerging and historical problems: an overview of the main toxigenic fungi and mycotoxin concerns in Europe*, in *Mycotoxins*.

- Edited by Leslie, J., Bandyopadhyay, R., and Visconti, A. CABI, Oxfordshire, UK, 139.
- McLAUGHLIN C.S., VAUGHN M.H., CAMPBELL J.M., WEI C.M., STANFORD M.E., HAN-SIN B.S. (1977): *Inhibition of protein synthesis by trichothecenes*, in: *Mycotoxins in human and animal health*, Edited by J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine, and M.A. Mehlman. Pathotox Publishers, Park Forest South, Ill., USA, pp. 262.
- MARASAS W.F.O., GELDERBLOM W.C.A., SHEPHARD G.S., WISMER H.F. (2008): *Mycotoxins: A global problem*, in *Mycotoxins*, Edited by Leslie, J., Bandyopadhyay, R., and Visconti, A. CABI, Oxfordshire, UK, pp. 139.
- McCORMICK, S.P., HARRIS, L.J., ALEXANDER, N.J., OUELLET, T., SAPARNO, A., ALLARD, S., DESJARDINS, A.E. (2004): *Tri1 in Fusarium graminearum encodes a P450 oxygenase*, «Applied and Environmental Microbiology», 70, pp. 2044-2051.
- McCORMICK S.P., HOHN T.M., DESJARDINS A.E. (1996): *Isolation and characterization of Tri3, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from Fusarium sporotrichioides*, «Applied and Environmental Microbiology», 62, pp. 353-359.
- MILLER J.D. (1995): *Fungi and mycotoxins in grain: implication for stored product research*, «Journal of Stored Products Research», 31, pp. 1-16.
- O'DONNELL K., KISTLER H.C., TACKE B.K., CASPER H.H. (2000): *Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of Fusarium graminearum, the fungus causing wheat scab*, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 97, pp. 7905-7910.
- O'DONNELL K., WARD T.J., GEISER D.M., KISTLER H.C., AOKI T. (2004): *Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the Fusarium graminearum clade*, «Fungal Genetics and Biology», 41, pp. 600-623.
- O'DONNELL K., CIGELNIK E. (1997): *Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus Fusarium are nonorthologous*, «Molecular Phylogenetics and Evolution», 7 (1), pp. 103-116.
- PACIOLLA C., DIPIERRO N., MULÈ G., LOGRIECO A., DIPIERRO S. (2004): *The mycotoxins beauvericin and T-2 induce cell death and alteration in the ascorbate metabolism in tomato protoplasts*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 65, pp. 49-56.
- PACIOLLA C., IPPOLITO M.P., LOGRIECO A., DIPIERRO N., MULÈ G., DIPIERRO S. (2008): *A different trend of antioxidant responses makes tomato plants less susceptible to beauvericin than T—2 mycotoxin phytotoxicity*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 72, pp. 3-9.
- PANCALDI D., ALBERTI I. (2001): *Le principali malattie su foglia e spiga del frumento*, «L'Informatore Agrario», 20, pp. 63-69.
- PASQUINI M., DELOGU G. (2005): *Malattie dei cereali a paglia*, Ed Regione Lombardia, Garlasco (PV), Italy, PromoPavese Press.
- PROCTOR R.H., DESJARDINS A.E., PLATTNER R.D., HOHN T.M. (1999): *A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in Gibberella fujikuroi mating population A*, «Fungal Genetics and Biology», 27, pp. 100-112.
- QUARTA A., MITA G., HAIDUKOWSKI M., SANTINO A., MULÈ G., VISCONTI A. (2005): *Assessment of trichothecene chemotypes of Fusarium culmorum occurring in Europe*, «Food Additives and Contaminants», 22, pp. 309-315.
- QUARTA A., MITA G., HAIDUKOWSKI M., LOGRIECO A., MULÈ G., VISCONTI A. (2006): *Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in Fusarium*, FEMS Microbiology Letters, 259, pp. 7-12.

- RIO G., PINSON-GADAIS L., ABECASSIS J., ZAKHIA-ROZIS N., LULLIEN-PELLERIN V. (2009): *Assessment of dehulling efficiency to reduce deoxynivalenol and Fusarium level in durum wheat grains*, «Journal of Cereal Science», 49, pp. 387-392.
- ROSSI V., TERZI V., MOGGI F., MORCIA C., FACCIOLI P., HAIDUKOWSKI M., PASCALE M. (2007): *Assessment of Fusarium infection in wheat heads using a quantitative polymerase chain (QPCR) assay*, «Food Additives and Contaminants», 24 (10), pp. 1121-1130.
- ROSSI V., GIOSUÈ S., CIGOLINI M., DELOGU G., FACCINI N., TERZI V., SCUDELLARI D. (2006): *Un aiuto alla gestione della fusariosi della spiga*, «L'Informatore Agrario», 14, pp. 62-68.
- SOMMA S., ALVAREZ C., RICCI V., FERRACANE L., RITIENI A., LOGRIECO A., MORETTI A. (2010): *Trichothecene and beauvericin production and amplified fragment length polymorphism analysis of Fusarium poae isolated from wheat kernels in Northern-Italy*, «International Journal of Food Microbiology», in stampa.
- STACK R.W. (2003): *History of Fusarium head blight with emphasis on North America*, In *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley* (Leonard, K.J. and Bushnell, W.R., eds). St. Paul, MN: APS Press, pp. 1-34.
- STARKEY D.E., WARD T.J., AOKI T., GALE L.R., KISTLER H.C., GEISER D.M., SUGA H., TÓTH B., VARGA J., O'DONNELL, K. (2007): *Global molecular surveillance reveals novel Fusarium head blight species and trichothecene toxin diversity*, «Fungal Genetics and Biology», 44, pp. 1191, 2007.
- TAG A.G., GARIFULLINA G.F., PEPLOW A.W., AKE C. JR., PHILLIPS T.D., HOHN T.M., BEREMAND M.N. (2001): *A novel regulatory gene, Tri10, controls trichothecene toxin production and gene expression*, «Applied and Environmental Microbiology», 67, pp. 5294-5302.
- TERZI V., MORCIA C., FACCIOLI P., FACCINI N., ROSSI V., CIGOLINI M., CORBELLINI M., SCUDELLARI D., DELOGU G. (2007): *Fusarium DNA traceability along the bread production chain, International*, «Journal of Food Science and Technology», 42 (12), pp. 1390-1396.
- TORP M., NIRENBERG H.I. (2004): *Fusarium langsethiae sp. nov. on cereals in Europe*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 247-256.
- TORP M., LANGSETH W. (1999): *Production of T-2 toxin by a Fusarium resembling Fusarium poae*, «Mycopathologia», 147, pp. 89-96.
- THRANE U., ASLER A., CLASEN P., GALVANO F., LANGSETH W., LEW H., LOGRIECO A., NIELSEN K., RITIENI A. (2004): *Diversity in metabolite production by Fusarium langsethiae, Fusarium poae, and Fusarium sporotrichioides*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 257-266.
- UENO Y. (1984): *Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes*, *Fundamental and Applied Toxicology*, 4, S124.
- WAALWIJK C., VAN DER HEIDE R., DE VRIES I., VAN DER LEE T., SCHOEN C., COSTRELE DE CORAINVILLE G., HAUSER-HAHN I., KASTELEIN P., KÖHL J. et al. (2004): *Quantitative detection of Fusarium species in wheat using TaqMan*, «European Journal of Plant Pathology», 110, pp. 481-494.
- WARD T.J., BIELAWSKI J.P., CORBY KISTLER H., SULLIVAN E., O'DONNELL K. (2002): *Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic Fusarium*, «Proceeding of the National Academy of Science», 99, pp. 9278-9283.
- WARD, T.J., CLEAR, R.M., ROONEY, A.P., O'DONNELL, K., GABA, D., PATRICK, S., STARKEY, D.E., GILBERT, J., GEISER D.M., NOWICKI, T.W. (2008): *An adaptive evolutionary*

- shift in Fusarium head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic Fusarium graminearum in North America*, «Fungal Genetics and Biology», 45, pp. 473-484.
- XU X.M., PARRY D.W., NICHOLSON P., THOMSETT M.A., SIMPSON D., EDWARDS S.G., COOKE B.M., DOOHAN F.M., BRENNAN J.M., MORETTI A., TOCCO G., MULE G., HORNOK L., GICZEY G., TATNELL J. (2005): *Predominance and association of pathogenic species causing Fusarium ear blight in wheat*, «European Journal of Plant Pathology», 112, pp. 143-154.
- YLI-MATTILA T., MACH R.L., ALEKHINA I.A., BULAT S.A., KOSKINEN S., KULLNIG-GRADINGER C.M., KUBICEK C.P., KLEMSDAL S.S. (2004): *Phylogenetic relationship of Fusarium langsethiae to Fusarium poae and F. sporotrichioides as inferred by IGS, ITS, -tubulin sequence analysis and UP-PCR*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 267-285.
- YLI-MATTILA T., PAAVANEN-HUHTALA S., JESTOI M., PARIKKA P., HIETANIEMI V., GAGKAEVA T., SARLIN T., HAIKARA A., LAAKSONEN S., RIZZO A. (2008): *Real-time PCR detection and quantification of Fusarium poae, F. graminearum, F. sporotrichioides and F. langsethiae in cereal grains in Finland and Russia*, «Archives of Phytopathology and Plant Protection», 41, pp. 243-260.
- YLI-MATTILA T., GAGKAEVA T., WARD T.J., AOKI T., KISTLER H.C., O'DONNELL K. (2009): *A novel Asian clade within the Fusarium graminearum species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East*, «Mycologia», 101, pp. 841-852.